

魚針草中之類二萜類化合物魚針草酸的萃取和純化分離

李珮鈞¹、曾德毓²、李建明^{1*}

¹國立臺東大學應用科學系 ²凱耀投資股份有限公司

摘要

從天然物中萃取出抗癌藥物對於生物系統中的研究早已成為近年來熱門的題材，相關的研究也是日益蓬勃發展。中藥草是結構多樣的倍半萜和二萜類化合物的豐富來源。特別是天然草本植物-魚針草 (*Anisomeles indica*)提供了許多類二萜類化合物，包括魚針草內酯(Ovatodiolide)和魚針草酸(Anisomelic acid)，兩者均為一種類大環二萜類之化合物。並被先前研究證實可治療特定癌細胞生長和預防癌症疾病，以及表現出好的人類免疫缺陷病毒(HIV)的抑制活性和其他有效抑制功用，是一種極具潛力開發為抗癌藥物的天然物。

透過溶劑萃取魚針草乾燥全株並搭配管柱層析法和擴散長晶純化方式，實驗室已成功分離出具有生物活性之魚針草內酯類大環二萜類化合物，且透過各式光譜的量測例如，NMR、FT-IR、GC-MS 和 X-ray 單晶繞射實驗來鑑定魚針草內酯的成分和立體結構。在這篇報導裡，我們更詳細的描述如何萃取魚針草中微量的魚針草酸，透過各式光譜的量測，包含:TLC、NMR、FT-IR、GC-MS 和 HPLC 光譜，我們成功鑑定出魚針草酸。此外，我們也成功長出魚針草酸單晶，透過 X-ray 單晶繞射實驗成功鑑定魚針草酸的立體結構。與魚針草內酯比較，結構上魚針草酸是羧酸基的方式存在，大大增加其水溶性和生物活性的測試。

關鍵字：天然物、魚針草酸、魚針草內酯、類大環二萜類化合物

¹李珮鈞，國立臺東大學應用科學系學生。E-mail：10810214@gm.nttu.edu.tw

²曾德毓，凱耀投資股份有限公司。E-mail：rdytzeng@gmail.com

¹李建明(通訊作者)，國立臺東大學應用科學系教授。E-mail：cmlee@nttu.edu.tw

Anisomelic Acid, a Macrocyclic Diterpenoid Isolated from *Anisomeles Indica*

Pei-Ju Lee¹, Deyue Robert Tzeng², Chien-Ming Lee^{1*}

Abstract

The natural products extracted from herbs have attracted considerable attentions, due to their varied roles in biological systems. Ovatodiolide and anisomelic acid can be isolated from the natural herbs named *Anisomeles indica*. The structures of both natural products are similar and can be described as a macrocyclic diterpenoid compound. In biological studies, two natural products exhibit varied functions. For example, ovatodiolide can serve as an inhibitor for specific cancer cell growth and for regulation of HIV activity in a cell-based assay.

In previous report, we successfully isolated the ovatodiolide from *Anisomeles indica* and the procedures we utilized are classified as green chemistry. In this study, we make efforts to isolate and purify the smaller amounts of anisomelic acid compared to that of ovatodiolide. Anisomelic acid bearing a carboxyl group shows better water-soluble property than that of ovatodiolide. The FTIR, TLC, NMR, GC-MS and HPLC spectroscopic studies confirmed the composition of anisomelic acid. The geometric structure of anisomelic acid was also determined by single-crystal X-ray diffraction. The compound, anisomelic acid crystalizes in crystal system, monoclinic; space group, P2₁; unit cell dimensions, a = 9.2679(3), b = 9.2146(3), c = 10.7708(4) Å ; final R indices [$I > 2\sigma(I)$], R1 = 0.0429, wR2 = 0.1065.

Keywords: Natural product, Anisomelic Acid, Ovatodiolide, Diterpenoids

¹Pei-Ju Lee, Department of Applied Science, National Taitung University, E-mail: 10810214@gm.nttu.edu.tw

²Deyue Robert Tzeng, E-mail : rdytzeng@gmail.com

¹Chien-Ming Lee, Department of Applied Science, National Taitung University, E-mail: cmlee@nttu.edu.tw

壹、前言

由文獻探討中得知，天然產物早已成為癌症化療的藥物。台灣原生種魚針草為一種台灣特有之一年生草本植物，生長於台灣全島平地至低海拔山區林緣或荒廢地中，台灣魚針草在傳統民間用藥使用頻繁，臨床應用範圍廣。傳統上魚針草已被用作抗炎藥，具有抵抗胃腸道疾病的活性，並用於免疫系統缺陷以及肝臟疾病，研究證實魚針草 (*Anisomeles indica*) 中主要的活性物質-魚針草內酯 (Ovatodiolide) 和魚針草酸 (Anisomelic acid) 具有多樣的生物活性且能抑制某些特定癌細胞的生長，因此有潛能發展成為未來的天然藥物。

我們可透過分離和純化的技術，從魚針草中萃取出類大環二萜類化合物之魚針草內酯和魚針草酸，魚針草酸和魚針草內酯相比，雖然含量少了很多，但由於魚針草酸是含有羧基的有機化合物，在水溶性和生物活性的層面上來看，比目前已知的魚針草內酯更具優勢及開發潛力。

貳、文獻回顧

從藥用植物-魚針草中萃取出之魚針草內酯透過各式光譜的鑑定 (NMR 和 X-ray 單晶繞射實驗等)，發現其為類大環二萜類化合物，結構上具有獨特的三個環 (圖一，Manchand & Blount, 1977)，環的數目分別為 5, 14 和 5。其中一個五環片段分子為丁烯內酯 (butenolide)，另一個五環片段分子為反式 α -亞甲基- γ -內酯 (trans- α -methylene- γ -lactone)。另外，主架構十四環狀分子為大環二萜類片段分子 (macrocyclic diterpenoid)。(圖 1)

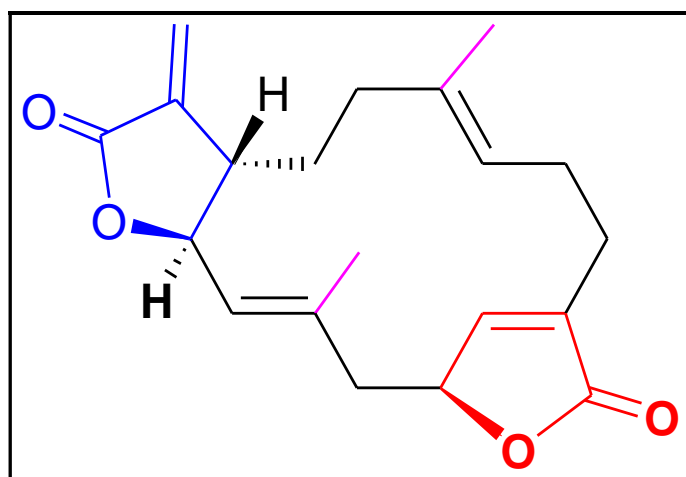


圖 1、魚針草內酯結構示意圖，其中紅色標示為五環片段分子丁烯內酯、藍色標示為五環片段分子為反式 α -亞甲基- γ -內酯、黑色標示(含部分藍、紅色標示)為主架構十四環狀分子為二萜類片段分子。

M. Arisawa 團隊在 1985 年從中藥防風草的干燥全株中分離得到 6 種新型化合物 (圖二, M. Arisawa & M. Nimura, 1986), 其中包含了 3 種新型大環二萜類化合物, 分別為: ovatodiolide (1), 4, 5-epoxyovatodiolide (2) 和 anisomelic acid (3)。利用甲醇萃取分離, 再將甲醇萃取物經管柱層析分離和薄層層析分離, 最後分離得到 6 個大環二萜類化合物(圖 2)(1)~(6)。透過光譜數據分析與已知相關化合物的光譜數據進行比對, 預測了這些天然化合物的結構如圖二。在生物活性測試上, 這些化合物表現了血管緊張素轉化酶抑制活性、細胞毒活性和鈣拮抗活性。

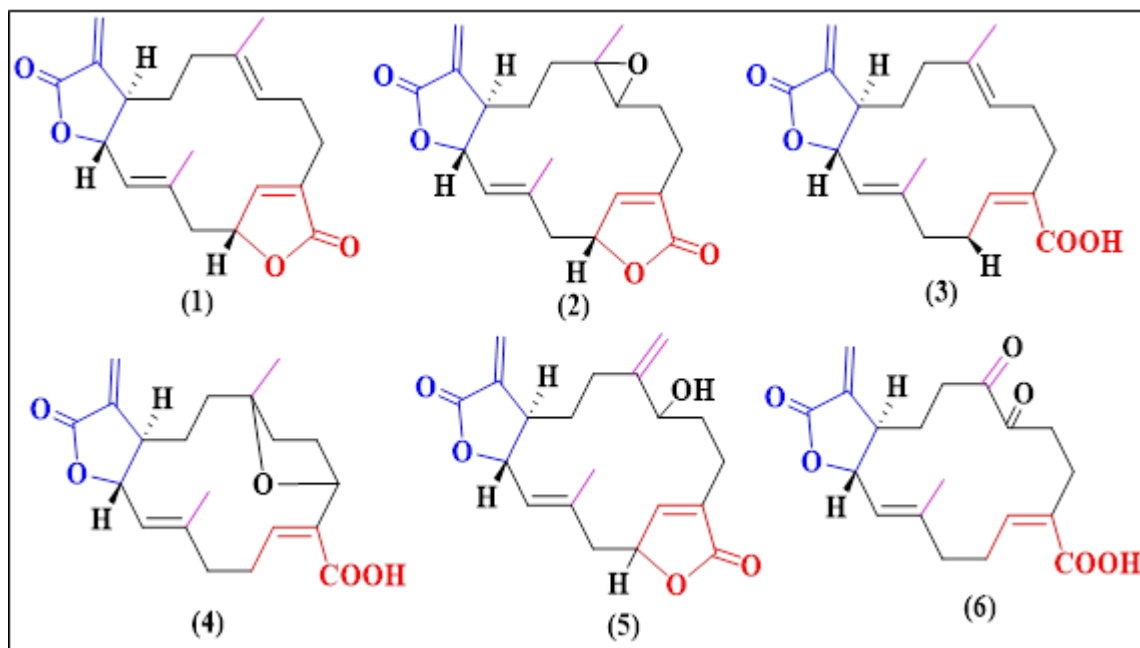


圖 2、甲醇萃取分離後得到的 6 個大環二萜類化合物

Michael R. Boyd 研究團隊在 2000 年對軟珊瑚 *Lobophytum* 物種進行許多研究(圖三, Michael R. Boyd, 2000)。海蜇科的海洋無脊椎動物是結構多樣的倍半萜和二萜的豐富來源。特別是菲律賓群島軟珊瑚 *Lobophytum* 物種屬提供了許多 cembranoid 二萜類化合物。將軟珊瑚 *Lobophytum* 物種的水萃取物進行分餾, 成功得到三種產物(圖 3), 分別為 Lobohedleolide (7)、(7Z)-lobohedleolide (8) 和新化合物 17-dimethylaminolobohedleolide (9)。並利用高效液相層析儀(HPLC)從這些提取物中純化, 藉由光譜分析來預測三個化合物的結構, 並將它們的光譜數據與先前報導的值進行比較。發現化合物(9)是第一個從軟珊瑚 *Lobophytum* 物種中分離出的二萜類化合物(cembranane)。在細胞的體外抗人類免疫缺陷病毒(HIV)試驗中, 初級抗 HIV 實驗中發現化合物(9)具有豐富的生物活性, 證明二萜類化合物能表現出不錯的 HIV 抑制活性。此研究提供了一種新的二萜類化合物, 並有望成為極好的抑制 HIV 活性藥物。

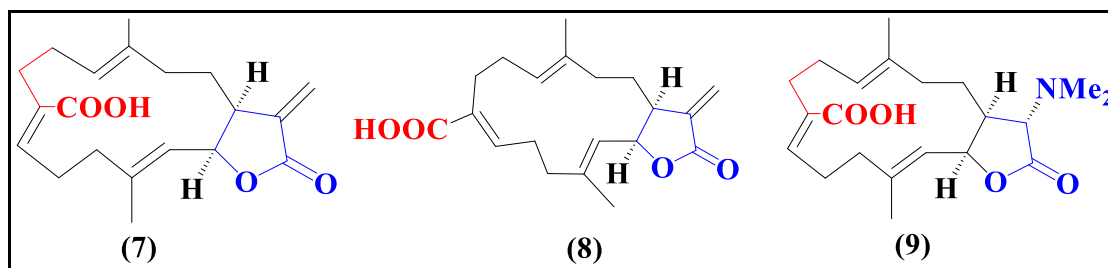


圖 3、軟珊瑚 *Lobophytum* 物種中萃取分離後得到的三種大環二萜類化合物

Yerra Koteswara Rao 團隊在 2013 年發現魚針草內酯(Ovatodiolide)會抑制過敏源誘導的骨髓衍生樹突狀細胞的成熟和誘導 T-helper type 2(Th2)細胞分化 (Yerra Koteswara Rao, 2013)。骨髓的白細胞能提供免疫細胞中的樹突狀細胞 (DCs)，在初始免疫反應中扮演關鍵作用。當發育未完全的樹突狀細胞(主要源於骨髓前驅細胞)存在於和外部環境接觸的血液或組織中時，能表現出高內吞活性和低 T 細胞活化的能力。在誘導 Th2 細胞分化方面，魚針草內酯除了具有發炎性皮膚病症及免疫系統缺陷功效外。魚針草內酯還具有廣泛的生物活性，包括抗癌、抗炎、抗幽門螺旋桿菌和抗 HIV。主要藥理作用是魚針草內酯能損害 Th2 免疫反應，因為 Th2 淋巴細胞的過度生產和激活在過敏性炎症中起重要作用。此外，此篇報導還發現魚針草內酯可以減弱 CD4⁺ T 細胞的增殖，還能透過魚針草內酯抑制 CD4⁺ T 細胞增殖的。透過這些實驗，瞭解魚針草內酯或其衍生物作為針對各種自身免疫疾病的免疫調節劑具有巨大潛力。

Yew-Min Tzeng, and Wan-Chi Tsai 等人的研究團隊在 2016 年研究魚針草內酯可以有效的去抑制 STAT-3 及其上游激酶(Yew-Min Tzeng & Wan-Chi Tsai, 2016)。魚針草內酯能夠抑制細胞增殖和誘導細胞凋亡，在胰腺癌細胞中透過劑量的調控表現出具有細胞毒性，而且 MMP-9 和 FAK 的 mRNA 也顯著降低。魚針草內酯亦可抑制 IκB 激酶進而使核因子 NF-κB 失活。另外，魚針草內酯可抑制 NF-κB，讓 STAT3 途徑減少 MMP-9 和 FAK 轉錄。最後達到抑制 MIA PaCa-2 癌細胞的增殖進而誘導凋亡。此篇報導證實魚針草內酯在胰腺癌治療中具有新的治療和抗轉移潛力。

Yahui Ding, Liang Wang, and Yue Chen 等人的研究團隊在 2020 年從藥用植物中分離出許多具有 α-亞甲基-γ 內酯部分的萜內酯，並發現其具有廣泛的生物活性和藥理活性(圖四，Yahui Ding, Liang Wang & Yue Chen, 2020)。魚針草內酯帶有活性 α-亞甲基-γ-內酯部分，在肝微粒體中高度不穩定，若引入官能基團，如:烷氧基、氨基、胺甲醯基、羥基和硫醇，用不同的鹼與溶劑可使目標化合物易於獲得與具有高產率。通過將二甲氨基轉換為 N-methylpiperazine(NMP)，部分的 NMP-diepoxyovatodiolide (圖 4) 顯著改善了魚針草內酯的活性且持續釋放，導致代謝穩定性能顯著提高。此外，NMP-diepoxyovatodiolide 在急性自身免疫性肝炎小鼠實驗中表現出非常出色的治療數據。因此，NMP-diepoxyovatodiolide 具有前景能夠成為治療肝臟之藥物。

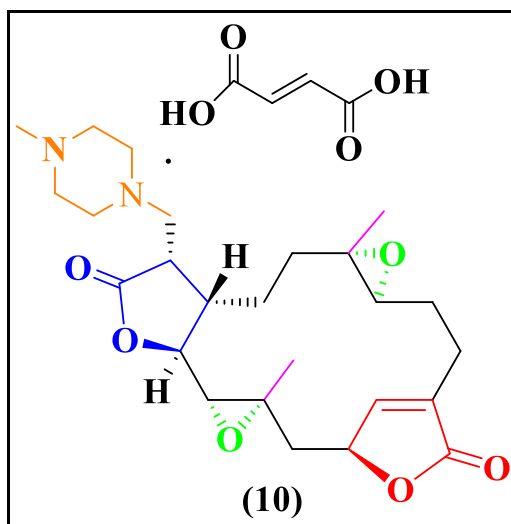


圖 4、NMP-diepoxyovatodioidide 結構式

由 Mei-Kang Yuan 和 Ping-Jyun Sung 帶領的研究團隊在 2021 年，利用溶劑萃取從廣泛分佈於熱帶印度太平洋，包括台灣海域，黑潮海流的 *Lobophytum*、*Sarcophyton* 和 *Simularia* 屬八角珊瑚 *Lobophytum crassum* 中獲得了兩種 cembranoids 化合物(圖五，Mei-Kang Yuan & Ping-Jyun Sung, 2021)。其中一種為新化合物 lobocrassin(1)以及一種已知的類似化合物 lobohedleolide(2)。此兩種萃取化合物均利用 X-ray 晶體繞射儀器鑑定其結構(圖 5)。在生物活性測定上，顯示出兩種天然物能抑制誘導型一氧化氮合酶 (iNOS) 對小鼠巨噬細胞的蛋白質顯示出具有生物活性。

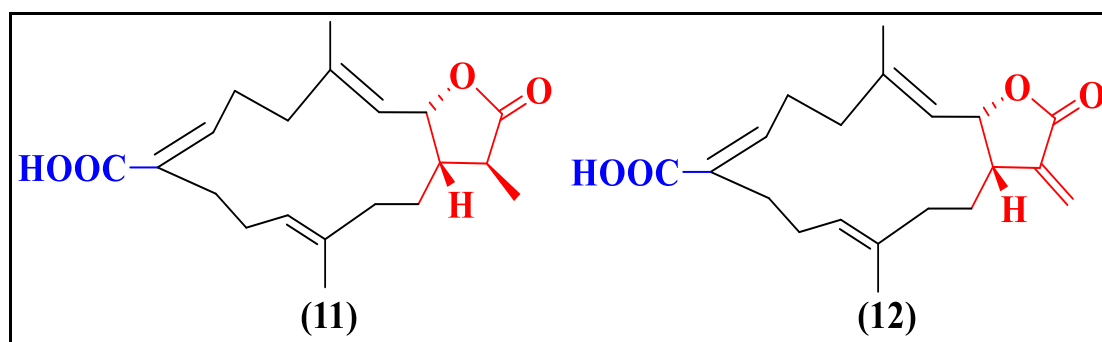


圖 5、八角珊瑚 *Lobophytum crassum* 中獲得了兩種 cembranoids 化合物

化學上魚針草酸(Anisomelic acid)的合成早在 1987 由 DeHoff 教授研究團隊成功發表(James A. Marshall & Bradley S. DeHoff, 1987)，然而，所得到的魚針草酸是光旋混合物-(±)-anisomelic acid。最近由 Yang 教授帶領的研究團隊成功地合成出光學純的魚針草酸-(-)-anisomelic acid，並將魚針草內酯和魚針草酸用於新冠病毒(SARS-CoV-2)抗病毒測試，研究發現比目前臨床用藥瑞德西偉(remdesivir)所需要的濃度還低就可以達到相同的抑制病毒效果(Yew-Min Tzeng & Zhen Yang, 2022)。

參、研究動機

天然產物早已成為癌症化療的藥物。傳統上魚針草已被用作抗炎藥，具有抵抗胃腸道疾病的活性，並用於免疫系統缺陷以及肝臟疾病，研究證實魚針草內酯具有多樣的生物活性且能抑制某些特定癌細胞的生長，因此有潛力能發展成為未來的天然藥物。

在了解先前的文獻研究後，我們透過分離和純化的技術，從天然物魚針草萃取出之魚針草酸，魚針草酸和魚針草內酯相比，由於魚針草酸是一具有羧酸基(carboxyl group)的有機化合物，在水溶性的層面上來看，比目前已知的魚針草內酯更具優勢及開發潛力，因此我們希望能從魚針草中開發出更具有藥用價值之天然活性物，希望能夠試著找出此目標化合物，並提高產量，再透過各式光譜 (NMR, IR, X-ray 單晶繞射質譜)來鑑定所獲得之魚針草酸化合物，期許未來以這樣對環境較友善的實驗方式來提取具有生物活性物質。

肆、材料與方法

一、藥品與溶劑

1. 魚針草, *Anisomeles indica*
2. 正己烷, n-Hexane, C₆H₁₄
3. 乙酸乙酯, ethyl acetate, CH₃COOCH₂CH₃, EA
4. 矽膠, Silica Gel, SiO₂
5. 四氫呋喃, Tetrahydrofuran, C₄H₈O, THF
6. 異丙醇, isopropanol, C₃H₈O, IPA
7. 二氯甲烷, Dichloromethane, CH₂Cl₂, DCM
8. 活性碳, Activated carbon

二、儀器、裝置介紹

1. 傅立葉轉換紅外線光譜儀(FT-IR)
2. 核磁共振儀(NMR)
3. 減壓濃縮系統
4. 氣相層析質譜儀(ESI-MS)
5. 電子天平(Mettler Toledo, B204-S)
6. 管柱層析管
7. 紫外燈(Compact UV Lamps)
8. 薄層層析片, 鋁片

三、實驗步驟

本實驗為追求產量與效率，參考實驗中的方法並進行改良，最終得到以簡單的步驟進行實驗之方法如下：

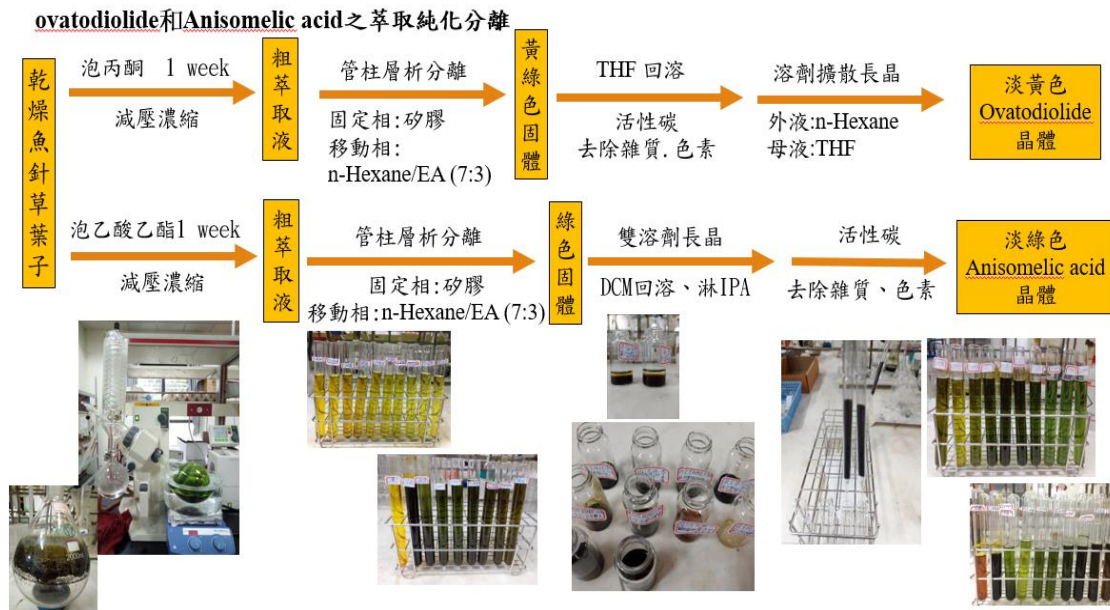


圖 6、魚針草酸和魚針草內酯之萃取純化分離示意圖

魚針草內酯(ovatodiolide)之萃取純化分離(王安宸,曾德毓&李建明. 2021) :

1. 將乾燥後的魚針草葉子與莖部混和浸泡在丙酮(10L)一週，得到深綠色魚針草粗萃取液。
2. 過濾粗萃取液，轉移至濃縮瓶中，以減壓濃縮系統進行濃縮，可得深綠色濃縮萃取液。
3. 將濃縮萃取液以管柱進行分離，管柱中加入以沖提液潤濕的氧化鋁作為靜相，沖提使用液 Hexane/EA(7:3)作為移動相，進行分離。
4. 分離出的沖提液收集約 40 支試管，每支約 8 分滿，並放置通風櫥中等待其揮發長晶。
5. 各試管揮發至剩 1/5 後將析出之晶體收集，並把剩餘溶劑每 3~4 支收集至 1 個小 sample 瓶是為內相液，放入另一裝有外相液 Hexane 之大 sample 瓶，進行二次長晶。
6. 將第一次在試管中結晶出之晶體以 THF 重新溶解轉移至小 sample 瓶是為內液，放入另一裝有外液 Hexane 之大 sample 瓶，利用擴散長晶方式使晶體純化。
7. 收集所有長晶完成之晶體以電子天秤稱量，得到約 2.56g 魚針草內酯結晶，產率約為 0.51%。
8. 將所得到的魚針草內酯結晶晶體進行各式光譜的量測例如，NMR、FT-IR、ESI-MS、HPLC 和 X-ray 單晶繞射實驗，確認產物為魚針草內酯的成分和立體結構。

魚針草酸(Anisomelic acid)之萃取純化分離：

1. 將烘乾魚針草葉片以乙酸乙酯浸泡一週，一週後得到綠色粗萃取液。

2. 過濾綠色粗萃取液，去除萃取液中的莖葉、雜質。
3. 以減壓旋轉濃縮機濃縮粗萃取液，得到深綠色濃縮萃取液。
4. 濃縮萃取液加入無水硫酸鎂除水一日，以管柱層析進行分離，在管柱中加入以沖提液潤濕的矽膠作為靜相，使用不同的 n-Hexane/EA 比例(如 9:1, 8:2, 7:3, 6:4)作為流動相，分離混合物。
5. 收集 50 支試管的沖提液，每支約 7 分滿，並待揮發溶劑使其長晶。
6. 點 TLC 片檢測各試管的成分，待所有試管溶液揮發至剩 1/10。
7. 將我們要取的幾支試管收集，過活性碳去除雜質、色素。
8. 收集 5 支試管的沖提液，每支約 7 分滿，並待揮發溶劑使其長晶。
9. 晶體以 DCM 溶解，轉移至小 sample 瓶，在小 sample 瓶的瓶壁上再淋上異丙醇，雙溶劑長晶，以得到更加乾淨的晶體。
10. 待重新以 DCM 回溶後的溶劑揮發完後，將長出的晶體取出。
11. 將所得到的魚針草酸晶體進行各式光譜的量測如:NMR、FT-IR、ESI-MS、HPLC 和 X-ray 單晶繞射實驗，確認產物的成分和立體結構。

四、實驗方法探討

(一) 特色及可行性

近年來，天然產物早已成為癌症化療的藥物。利用不同溶劑從天然草本植物-魚針草葉片中能夠萃取出具有生物活性的大環二萜類魚針草內酯以及魚針草酸，後再經由簡單濃縮、分離和純化步驟，可得到魚針草內酯以及魚針草酸的晶體。

在分離及純化過程中，我們為求可以使用綠色化學的概念簡化了一些步驟，包括層析管柱的填充量和有機展開液的減量，更改良了層析管柱分離的部分，以綠色化學方式進行。即使分離的實驗效果不盡人意，沒有辦法得到完整純物質的產物，但我們利用產物溶解度不同的特性，經由再次擴散長晶、純化晶體的步驟，能夠找出我們的目標化合物魚針草酸，此化合物經由 NMR、FT-IR、ESI-MS、HPLC 及 X-ray 晶體繞射實驗等不同光譜可以得到證實。

(二) 研究常遇到的問題

1. 分離成功後要考慮產率，計畫以其他溶劑進行萃取或調整流動相 n-Hexane/EA 比例來去提高魚針草酸產量。
2. 在浸泡魚針草時，可以用哪種溶劑是既不會破壞魚針草酸，還能從中成功萃取出來，並且能在適當環境下長出晶體。
3. 魚針草酸的長晶方式及環境該如何操作，才能使產物的純度來的相對高。
4. 如何使魚針草酸易於獲得，且具高產率的生成，從中探討所需的條件。

伍、結果與討論

一、魚針草內酯(ovatodiolide)與魚針草酸(Anisomelic acid)的光譜鑑定比較

FT-IR 吸收光圖譜:(圖 7)

我們的製備方式是先取溴化鉀 (KBr) 固體和 1mg 的魚針草內酯及魚針草酸固體以約 50:1 的比例混合後研磨壓片，壓成可透光的薄鹽片後轉移到 FT-IR 儀固定槽進行光譜掃描。

對魚針草內酯的官能基做鑑定，如(圖 7 (black-line))所示，結果發現，在 1758 cm^{-1} 處的特徵峰是羰基 C=O 雙鍵的振動能量，在 2800 到 2900 cm^{-1} 處的特徵峰是烷基上 C-H 鍵的振動能量(王安宸,曾德毓&李建明. 2021)。

對魚針草酸的官能基進行鑑定分析，如(圖 7 (red-line)) 所示，結果發現，在 1684 cm^{-1} 左右的特徵峰是羰基 C=O 雙鍵的振動能量，在 2800 到 3000 cm^{-1} 左右的特徵峰是烷基上 C-H 鍵的振動能量，比魚針草內酯的特徵峰還來的明顯，而出現在 3378 cm^{-1} 處的特徵峰是羥基上 O-H 鍵的振動能量，和魚針草內酯的峰值明顯不同。

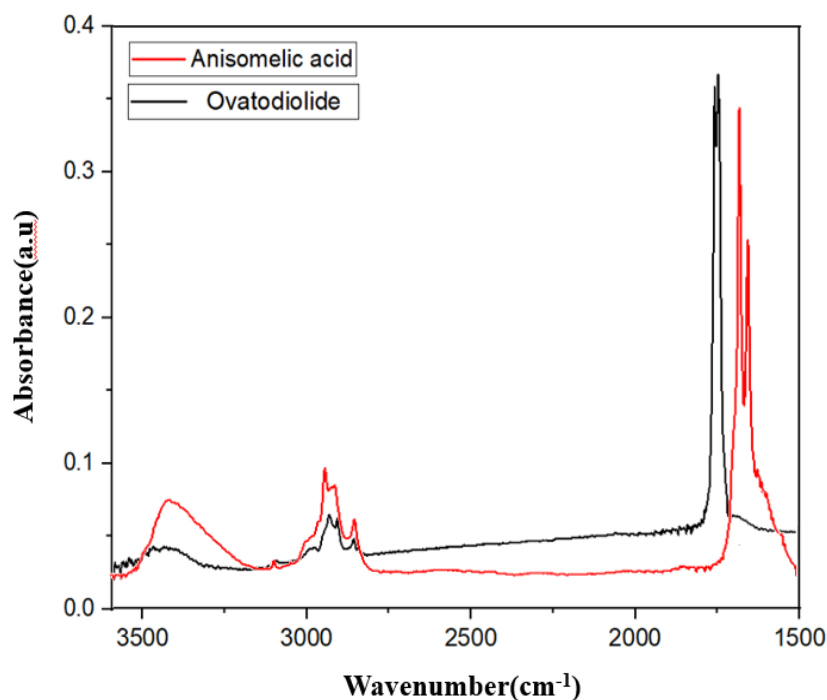


圖 7、 FT-IR spectral of Ovatodiolide and Anisomelic acid in KBr

ESI-MS 光譜圖:(圖 8)

我們的製備方式是先取魚針草內酯及魚針草酸晶體溶在乙酸乙酯溶劑中，配成 $1\mu\text{M}$ 的樣品濃度，封裝成瓶後送入 ESI-MS 儀器檢測。

透過 ESI-MS 質譜鑑定，發現所獲得的魚針草內酯晶體的成份如下圖 (圖 8)(A)所示，荷質比 (m/z) 為 351.03 和 351.98 與理論質(m/z: 351.298 (100.0%), 352.1708 (21.6%), $[C_{20}H_{24}O_4Na]^+$) 很靠近，證明成功分離長晶出魚針草內酯。而所獲得的魚針草酸晶體的成份如下圖(圖 8)(B)所示，荷質比 (m/z) 為 330.96 和 331.88 與理論質(m/z: 331.015 (100.0%), 332.078 (22.1%), $[C_{20}H_{27}O_4]^+$) 很靠近，證明成功分離長晶出魚針草酸(Uchio, Y., Toyota, J., Nozaki, H. & Nakayama, M 1981)。

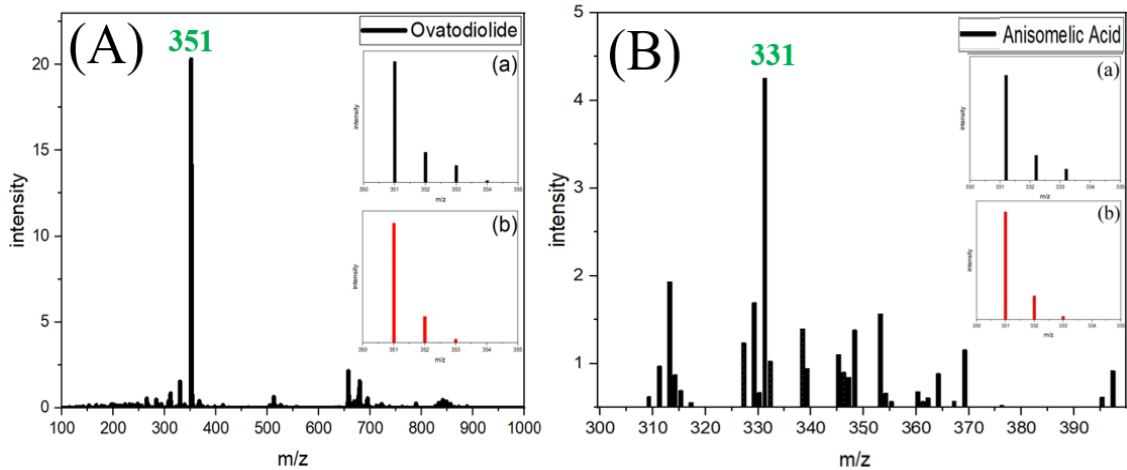


圖 8、ESI-MS spectral of (A) Ovatodiolide (B)Anisomelic acid in EA

HPLC 層析光譜圖: (圖 9)

我們藉由光學活性高效液相層析法對魚針草內酯及魚針草酸進行分析，將我們所分離得到的魚針草內酯及魚針草酸以乙酸乙酯溶解，層析分離使用 C18 作為移動相。以肉桂酸作為標準品。結果發現，魚針草酸有兩個極為靠近的峰值，由此懷疑魚針草酸有 R 及 S 對掌異構物的光學性質。(圖 9) (D)

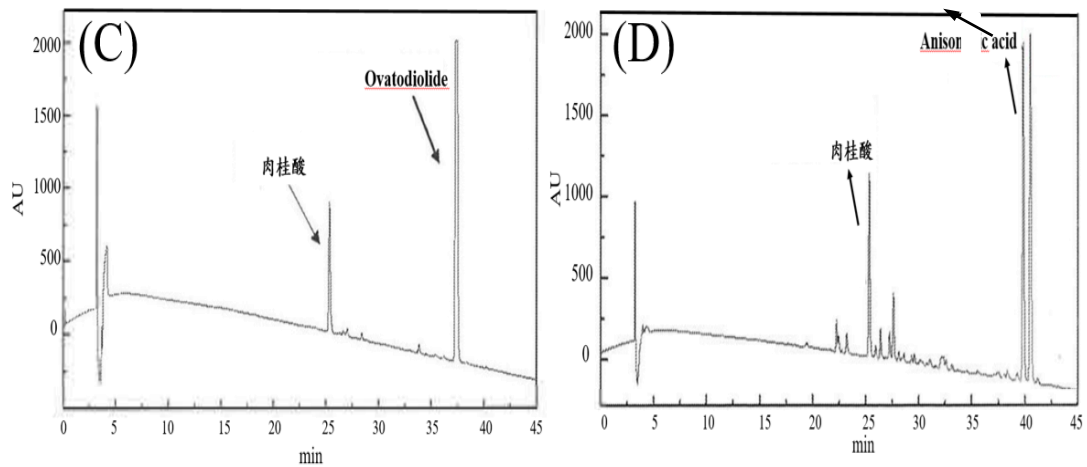


圖 9、HPLC spectral of (C) Ovatodiolide (D)Anisomelic acid in EA

單晶 X-ray 光譜儀:(圖 10)

在純化、分離長晶得到透明晶體後，將魚針草內酯及魚針草酸晶體送測台灣大學貴儀中心的單晶 X-ray 晶體繞射光譜儀解析晶體結構如(圖 10)所示(王安宸, 曾德毓, 李建明. 2021)。

所獲得的結果進一步地證實我們萃取、純化後的晶體為魚針草內酯及魚針草酸。我們成功長出的魚針草酸單晶與魚針草內酯比較，結構上是以羧酸基的方式存在(圖 10) (F)，大大增加其水溶性和生物活性的測試。

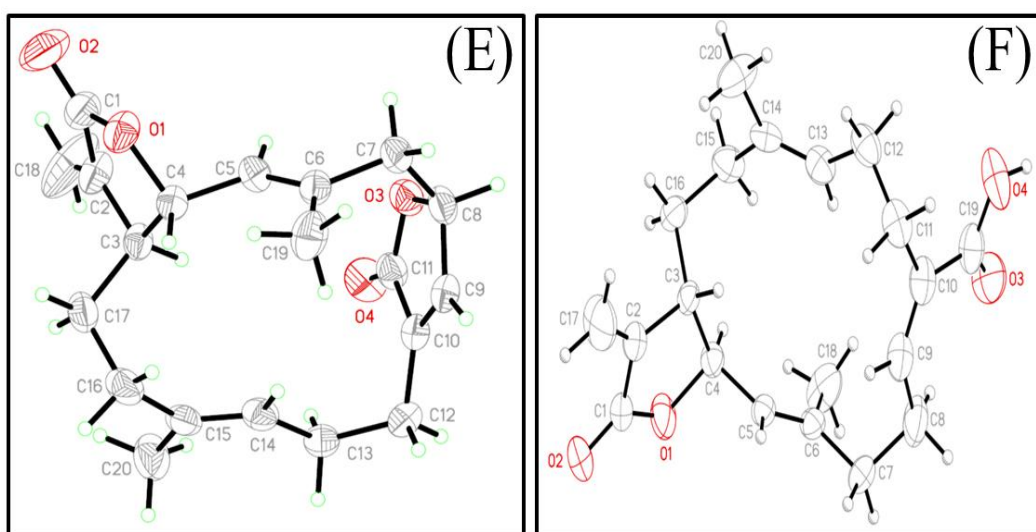


圖 10、ORTEP diagrams of (E) (+)-Ovatodiolide (F) (□)-Anisomelic acid

結構示意圖:(圖 11)

魚針草內酯(圖 11)(G)和魚針草酸(圖 11)(H)相比，從結構示意圖上可以發現兩者皆為類大環二萜類化合物，魚針草內酯結構的紅色標示為五環片段分子丁烯內酯，而魚針草酸結構的紅色標示為羧酸基，因為羧酸基的存在，使得魚針草酸的水溶性比魚針草內酯來得更好。

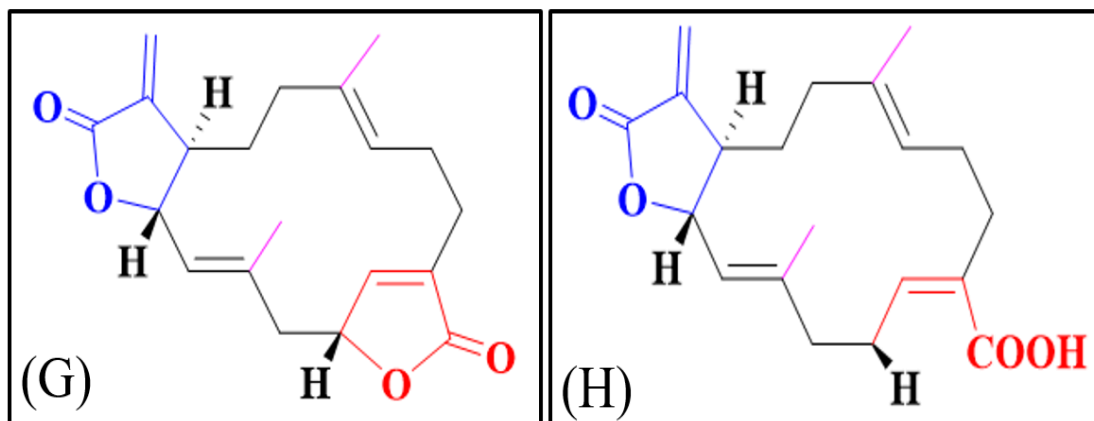


圖 11、結構圖 (G) Ovatodiolide (H) Anisomelic acid

二、魚針草酸(Anisomelic acid)的晶體結構參數(表 1~5)

魚針草酸晶體結構參數和鍵長和鍵角分別整理如下 (表 1~5)。其中 C(1)-O(1) 和 C(19)-O(3) 的鍵長分別為 1.330(3) 和 1.201(3) Å，符合 C-O 鍵的鍵長，C(1)-O(2) 的鍵長為 1.203(3) Å，符合羰基(C=O)雙鍵的鍵長。另外，C(5)-C(6), C(9)-C(10) 和 C(13)-C(14) 的鍵長分別為 1.328(2), 1.333(3) 和 1.320(3) Å，亦落在羰雙鍵的鍵長範圍。

表1. Crystal data and structure refinement for ic21280.

Identification code	ic21280	
Empirical formula	C20 H26 O4	
Formula weight	330.41	
Temperature	200(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 9.2679(3) Å	= 90°.
	b = 9.2146(3) Å	= 99.8060(10)°.
	c = 10.7708(4) Å	= 90°.
Volume	906.39(5) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.211 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.083 mm ⁻¹	
F(000)	356	
Crystal size	0.488 x 0.105 x 0.045 mm ³	
Theta range for data collection	1.919 to 29.998°.	
Index ranges	-13<=h<=13, -12<=k<=12, -15<=l<=15	
Reflections collected	37778	
Independent reflections	5248 [R(int) = 0.0342]	
Completeness to theta = 25.242°	99.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9602 and 0.9095	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5248 / 1 / 220	
Goodness-of-fit on F ²	1.041	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0429, wR2 = 0.1065	
R indices (all data)	R1 = 0.0481, wR2 = 0.1102	
Absolute structure parameter	0.0(3)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.203 and -0.133 e.Å ⁻³	

表2. Atomic coordinates (x 10⁴) and equivalent isotropic displacement parameters (Å² x 10³) for ic21280. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	-514(2)	4494(2)	4996(2)	56(1)
O(2)	-1442(2)	5158(3)	3053(2)	83(1)
O(3)	4770(2)	5686(2)	11327(2)	64(1)
O(4)	6960(2)	6122(3)	10838(2)	68(1)
C(1)	-385(2)	4975(3)	3855(2)	51(1)
C(2)	1183(2)	5170(2)	3784(2)	42(1)
C(3)	2064(2)	4658(2)	5000(2)	31(1)
C(4)	899(2)	4506(2)	5862(2)	33(1)

C(5)	866(2)	5716(2)	6773(2)	32(1)
C(6)	823(2)	5593(2)	7995(2)	34(1)
C(7)	840(2)	6916(3)	8813(2)	45(1)
C(8)	2295(3)	7081(4)	9725(2)	61(1)
C(9)	3545(3)	7234(3)	9019(2)	49(1)
C(10)	4940(3)	6831(2)	9343(2)	45(1)
C(11)	5995(3)	7026(3)	8431(2)	48(1)
C(12)	6552(2)	5591(3)	7966(2)	47(1)
C(13)	5353(2)	4548(3)	7444(2)	41(1)
C(14)	5185(2)	3796(2)	6386(2)	39(1)
C(15)	3897(2)	2780(2)	6039(2)	46(1)
C(16)	2843(2)	3217(2)	4851(2)	42(1)
C(17)	1615(4)	5644(5)	2759(3)	77(1)
C(18)	802(4)	4181(3)	8674(2)	63(1)
C(19)	5492(3)	6157(3)	10593(2)	48(1)
C(20)	6224(3)	3867(4)	5449(3)	66(1)

表 3. Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for ic21280.

O(1)-C(1)	1.330(3)	C(1)-O(1)-C(4)	111.87(15)
O(1)-C(4)	1.473(2)	O(2)-C(1)-O(1)	121.4(2)
O(2)-C(1)	1.203(3)	O(2)-C(1)-C(2)	129.2(2)
O(3)-C(19)	1.201(3)	O(1)-C(1)-C(2)	109.40(17)
O(4)-C(19)	1.342(3)	C(17)-C(2)-C(1)	121.9(2)
C(1)-C(2)	1.479(3)	C(17)-C(2)-C(3)	129.9(2)
C(2)-C(17)	1.311(3)	C(1)-C(2)-C(3)	108.10(17)
C(2)-C(3)	1.497(3)	C(2)-C(3)-C(16)	112.24(16)
C(3)-C(16)	1.533(3)	C(2)-C(3)-C(4)	102.77(15)
C(3)-C(4)	1.546(2)	C(16)-C(3)-C(4)	111.93(16)
C(4)-C(5)	1.489(3)	O(1)-C(4)-C(5)	107.89(15)
C(5)-C(6)	1.328(2)	O(1)-C(4)-C(3)	104.89(13)
C(6)-C(18)	1.494(3)	C(5)-C(4)-C(3)	115.01(15)
C(6)-C(7)	1.503(3)	C(6)-C(5)-C(4)	126.61(18)
C(7)-C(8)	1.535(3)	C(5)-C(6)-C(18)	124.34(19)
C(8)-C(9)	1.497(3)	C(5)-C(6)-C(7)	120.84(18)
C(9)-C(10)	1.333(3)	C(18)-C(6)-C(7)	114.80(17)
C(10)-C(19)	1.491(3)	C(6)-C(7)-C(8)	112.1(2)
C(10)-C(11)	1.510(3)	C(9)-C(8)-C(7)	110.83(19)
C(11)-C(12)	1.534(4)	C(10)-C(9)-C(8)	129.8(2)
C(12)-C(13)	1.504(3)	C(9)-C(10)-C(19)	121.4(2)
C(13)-C(14)	1.320(3)	C(9)-C(10)-C(11)	120.2(2)
C(14)-C(20)	1.511(3)	C(19)-C(10)-C(11)	118.4(2)
C(14)-C(15)	1.513(3)	C(10)-C(11)-C(12)	113.66(19)
C(15)-C(16)	1.526(3)	C(13)-C(12)-C(11)	113.83(18)
		C(14)-C(13)-C(12)	128.99(19)
		C(13)-C(14)-C(20)	124.0(2)
		C(13)-C(14)-C(15)	120.67(19)
		C(20)-C(14)-C(15)	115.3(2)
		C(14)-C(15)-C(16)	114.13(18)
		C(15)-C(16)-C(3)	112.76(17)
		O(3)-C(19)-O(4)	121.4(2)
		O(3)-C(19)-C(10)	127.0(2)
		O(4)-C(19)-C(10)	111.6(2)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

表 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for ic21280.

The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^* U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
O(1)	29(1)	98(1)	42(1)	-16(1)	4(1)	-12(1)
O(2)	56(1)	131(2)	50(1)	-29(1)	-19(1)	30(1)
O(3)	77(1)	69(1)	47(1)	14(1)	17(1)	3(1)
O(4)	62(1)	90(2)	45(1)	9(1)	-10(1)	-25(1)
C(1)	42(1)	71(2)	36(1)	-18(1)	-3(1)	11(1)
C(2)	46(1)	50(1)	28(1)	-1(1)	5(1)	6(1)
C(3)	32(1)	37(1)	26(1)	-3(1)	8(1)	-1(1)
C(4)	30(1)	40(1)	29(1)	-2(1)	7(1)	-3(1)
C(5)	33(1)	36(1)	29(1)	2(1)	8(1)	5(1)
C(6)	31(1)	41(1)	30(1)	2(1)	10(1)	6(1)
C(7)	47(1)	56(1)	36(1)	-7(1)	16(1)	7(1)
C(8)	58(1)	92(2)	34(1)	-18(1)	12(1)	-10(1)
C(9)	53(1)	58(1)	36(1)	-5(1)	8(1)	-12(1)
C(10)	54(1)	41(1)	39(1)	-1(1)	7(1)	-16(1)
C(11)	45(1)	51(1)	46(1)	8(1)	5(1)	-15(1)
C(12)	33(1)	59(1)	47(1)	10(1)	3(1)	-7(1)
C(13)	32(1)	48(1)	44(1)	8(1)	9(1)	-4(1)
C(14)	30(1)	34(1)	54(1)	8(1)	8(1)	8(1)
C(15)	42(1)	30(1)	63(1)	2(1)	5(1)	2(1)
C(16)	40(1)	41(1)	45(1)	-11(1)	9(1)	3(1)
C(17)	79(2)	114(3)	38(1)	22(2)	13(1)	10(2)
C(18)	97(2)	54(2)	45(1)	15(1)	34(1)	10(1)
C(19)	61(1)	42(1)	39(1)	-5(1)	4(1)	-14(1)
C(20)	61(2)	61(2)	86(2)	-14(1)	38(2)	-1(1)

表 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for ic21280.

	x	y	z	U(eq)
H(4)	7240	5851	11585	102
H(3)	2798	5415	5344	37
H(4A)	1039	3564	6327	40
H(5)	877	6673	6447	39
H(7A)	30	6850	9302	54
H(7B)	674	7789	8271	54
H(8A)	2250	7946	10261	73
H(8B)	2455	6219	10281	73
H(9)	3309	7687	8218	59
H(11A)	6844	7601	8846	57
H(11B)	5503	7586	7695	57
H(12A)	7143	5804	7305	56
H(12B)	7203	5118	8675	56
H(13)	4613	4412	7945	49
H(15A)	3349	2736	6751	55
H(15B)	4272	1793	5918	55
H(16A)	2100	2445	4637	50
H(16B)	3394	3301	4143	50
H(17A)	914	5872	2035	92
H(17B)	2630	5759	2741	92

H(18A)	1761	4013	9197	94
H(18B)	585	3393	8059	94
H(18C)	48	4211	9209	94
H(20A)	7086	4440	5803	99
H(20B)	5730	4323	4669	99
H(20C)	6529	2883	5265	99

陸、結論

本實驗透過使用不同溶劑搭配濃縮、管柱層析法和擴散長晶純化等方法從天然草本植物-魚針草中萃取出具有生物活性之化合物，且成功分離出具有生物活性之類大環二萜類化合物-魚針草內酯和魚針草酸，甚至成功長出魚針草酸單晶，最後透過各式光譜的量測例如，NMR、FT-IR、ESI-MS、HPLC 和 X-ray 單晶繞射實驗來鑑定魚針草內酯及魚針草酸的成分和立體結構。

從魚針草中萃取出微量的魚針草酸和魚針草內酯相比，魚針草酸在結構上是以羧酸基的方式存在，水溶性和生物活性的層面上比目前已知的魚針草內酯更具優勢及開發潛力，因此我們希望未來能從魚針草中開發出具有藥用價值或新型抗癌藥物之天然活性物，並提高產量，更期許未來以這樣對環境較友善的實驗方式來提取具有生物活性物質，能成功萃取出魚針草酸(Anisomelic acid)，未來的目標將朝綠色化學的概念持續改良層析管柱分離的部分，也期許未來有機會能和外校的實驗室合作，共同開發魚針草酸後續具有治療應用價值的藥物。

柒、謝誌

作者李建明感謝凱耀投資股份有限公司產學合作培訓計畫及花蓮玉里子修農園提供魚針草原料、國家科學及技術委員會經費(MOST 111-2113-M-143-005 -)和臺灣大學貴儀中心簡淑櫻博士單晶 X-ray 結構解析。

捌、參考文獻

- 王安宸,曾德毓,李建明.魚針草內酯(Ovatodiolide)之萃取和分離純化與光譜鑑定 *臺東大學綠色科學學刊* **2021**, *11*, 72-82.
- Arisawa, M., Nimura, M., Ikeda, A., Hayashi, T., Morita, N., Momose, Y., Takeda, R., Nakanishi S. Biologically Active Macrocyclic Diterpenoids from Chinese Drug "Fang Féng Cáo" I. Isolation and Structure. *Planta Med.* **1986**, 38–41.
- Cala, A., Zorrilla, J. G., Rial, C., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., Macías, A. F. Easy Access to Alkoxy, Amino, Carbamoyl, Hydroxy, and Thiol Derivatives of

- Sesquiterpene Lactones and Evaluation of Their Bioactivity on Parasitic Weeds. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 38, 10764–10773.
- Chen, J. H., Wu, A. T. H., Lawal, B., Tzeng, D.T.W., Lee, J. C., Ho, C. L., Chao, T. Y. Identification of Cancer Hub Gene Signatures Associated with Immune-Suppressive Tumor Microenvironment and Ovatodiolide as a Potential Cancer Immunotherapeutic Agent. *Cancers.* **2021**, *13*, 3847.
- Deng, Z. F., Bakunina, I., Yu, H., Han, J., Dömling, A., Ferreira, M. J. U., Zhang, J. Y. Research Progress on Natural Diterpenoids in Reversing Multidrug Resistance. *Frontiers in Pharmacology* **2022**, *13*, 815603.
- Hsieh, Y. J., Tseng, S. P., Kuo, Y. H., Cheng, T. L., Chiang, C. Y., Tzeng, Y. M., Tsai, W. C. Ovatodiolide of *anisomeles indica* exerts the anticancer potential on pancreatic cancer cell lines through STAT3 and NF- κ B regulation. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2016**, *10*, 1155, 8680372.
- Manchand, P. S., Blount, J. F. Stereostructures of the Macrocyclic Diterpenoids Ovatodiolide and Isoovatodiolide. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*(24), 3824–3828.
- Marshall, A. J., DeHoff, S. B. Cembranolide Total Synthesis “Anisomelic Acid”. *Tetrahedron.* **1987**, *43*, 21, 4849-4860.
- Mohammad A., Rashid, Kirk R., Gustafson, Boyd R. M. HIV-Inhibitory Cembrane Derivatives from a Philippines Collection of the Soft Coral *Lobophytum* Species. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 531-533.
- Rao, Y. K., Chen, Y. C., Fang, S. H., Lai, C. H., Geethangili, M., Lee, C. C., Tzeng, Y. M. Ovatodiolide inhibits the maturation of allergen-induced bone marrow-derived dendritic cells and induction of Th2 cell differentiation. *International immunopharmacology*, **2013**, *17*(3), 617-624.
- Uchio, Y., Toyota, J., Nozaki, H., Nakayama, M. Lohohedleolide and (7Z)-Lohohedleolide, New Cembranolides From the Soft Coral *Lobophytum Hedleyi* Whitelegge. *Tetrahedron Letters*, **1981**, *122*(41), 4089–3092.
- Xiang, J., Zhang, X., Wang, D., Li, J., Li, Q., Wang, Q., Ding, Y., Chen, T., Sun, Y., Bao, S., Chen, J., Li, D., Wang, L., Chen, Y. Chemical Modification of Ovatodiolide Revealed a Promising Amino-prodrug with Improved Pharmacokinetic Profile. *J. Name.* **2021**, *10*, 1039,00, 1-3.
- Yeh, Y. T., Lin, S. C., Lee, G. H., Wen, Z. H., Hwang, T. L., Wu, Y. J., Chen, J. J., Fang, L. S., Yuan, M. K., Sung, P. J. Cembranoids from Octocoral *Lobophytum crassum* (von Marenzeller, 1886). *Mar. Drugs.* **2021**, *19*, 130.
- Yu, H. X., Zheng, N., Yeh, C. T., Lee, C. M., Zhang, Q., Zheng, W. L., Chang, Q., Li, Y. H., Li, Y. J., Wu, G. Z., Quan, J. M., Zhang, L. Q., Tzeng, Y. M., Yang, Z. Identification and Semisynthesis of (–)-Anisomelic Acid as Oral Agent against SARS-CoV-2 in Mice. *National Sci. Rev.* **2022**, *176*, 6677426.